

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	複数の生物学的指標を組み合わせた長期放射線影響の予測と社会実装に向けた取り組み 「“on-site”リスク評価システムの開発および社会実装化への加速」
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

氏名		所属機関・職名
主任研究者	盛武敬	量子科学技術研究開発機構・上席研究員
分担研究者*	中村麻子	茨城大学・教授

氏名		所属機関・職名
研究協力者	鈴木孝明	群馬大学・教授

研究要旨	現代社会において懸念されている放射線被ばくの影響を正確に知るためには、迅速な線量評価手法の確立が求められている。申請者はこれまでの先行研究において DNA 損傷マーカー γ H2AX の検出を現場で行うための新規マイクロチップの開発を行ってきた。本研究ではマイクロチップの大量生産や全自動化に向けての開発を行った。また、 γ H2AX は DNA 損傷修復に伴う時間経過とともに消失していくことから、被ばく後時間が経過した後でも信頼性のある線量評価そしてリスク管理を行うために、「放射線被ばく痕跡」としてのテロメア損傷についてその低線量被ばくに対する有効性を検討した。これらのバイオマーカーによる線量評価・リスク評価を実用化するにあたっては、個人の生活情報や生体指標と DNA 損傷との相関性を明確にし、個人のバックグラウンドレベルの DNA 損傷をあらかじめ加味する必要があることから、健常人ボランティアなどから得られた生体サンプルを用いたデータベースの構築を目指した。
キーワード	バイオドシメトリ、DNA 損傷、テロメア、マイクロ流路チップ

I 研究目的

【背景・目的】

原子力規制委員会「原子力災害対策指針」（令和元年7月3日一部改正）に基づき緊急被ばく医療体制の整備が進められる中で、検討課題として迅速な線量評価手法の確立が求められている。申請者はこれまでの先行研究においてDNA損傷マーカー γ H2AXの検出を現場で行うための新規マイクロチップの開発を行ってきた。そこで本研究ではマイクロチップの大量生産や全自動化に向けての開発を行う。 γ H2AXの検出は、DNA損傷を定量的に測定するための非常に高感度なバイオマーカーである一方で、 γ H2AXのシグナルはDNA損傷修復に伴う時間経過とともに消失していく¹⁾。そこで、被ばく後時間が経過した後も信頼性のある線量評価そしてリスク管理を行うために、「放射線被ばく痕跡」としてのテロメア損傷についてその低線量被ばくに対する有効性を検討する。また、これらのバイオマーカーによる線量評価・リスク評価を実用化するにあたっては、個人の生活情報などとの相関性を明確にしておく必要があることから、健康人ボランティアなどから採取した生体サンプルを用いたデータベースの構築を行う。

【必要性】

放射線事故において最も必要なことは、被ばく線量をいち早く評価し、その生物学的リスクを予測・対応することである。DNA損傷レベルの迅速な解析システムの開発は必須である。また、万が一、迅速な線量評価が不可能であった場合でもいかなるタイムフレームであっても十分な被ばく線量評価が可能な生物学的指標が必要である。実験室でのデータが実社会において実用化されるためには、個人差を加味したデータが求められることから、ヒトの生体情報と様々なバイオマーカーとの相関性を蓄積したデータベースは必須であると考えられる。一つの生体サンプルを用いていくつかの生物学的指標を組み合わせ、信頼性の高い線量評価手法の確立に取り組む総合的研究は日本では特に少ない。したがって、本研究成果は、日本国民に対し簡易かつ効果的な被ばく線量測定システムを確立すると同時に、放射線被ばく後の様々なタイムフレームに最適な評価ツールの提唱につながると期待される。

【成果の環境保健行政への貢献】

晩期障害のしきい値には不確実性があるうえ、その症状は被ばく後数年～数十年を経て発生する。発生の予兆については未だ解明されておらず、現状では、事前に対策を講ずることが難しい。また、放射線被ばくの線量評価を被ばく後数年～数十年後に正確性をもって行う手法はこれまでに報告されていない。そこで、①本研究によりテロメア短縮やあるいは研究代表者のチームが検討するそのほかのバイオマーカーとの組み合わせによる新規のバイオマーカー指標が晩期障害のリスク予測マーカーとして機能することが分かれば、福島原発事故における被ばく者に適応することで、健康不安の軽減や適切な医療介入につながると期待される。②また、本研究によって開発中の全自動の γ H2AXアッセイデバイスは現場における被ばく線量評価および放射線のリスク評価デバイスとしての実用化が期待される。

なお、すでに研究分担者を中心に立ち上げた株式会社Dinowは、福島県あるいは県内自治体との連携を進めており、健康リスク管理としてのDNA損傷モニタリングの可能性を検討中である。株式会社Dinowの掲げるサービスを、福島県民を含め放射線被ばくに対する健康不安を感じる国民へ提供することで安心を提供するという点で社会的意義は大きい。本研究成果は単なる放射線被ばく管理分野への貢献だけでなく、環境保健行政の施策や方針決定への貢献が高いものであると考えられる。

II 研究方法

今年度（初年度）は、微量のヒト血液サンプルを用いてDNA損傷の測定を現場で迅速かつ簡便に行うための新規マイクロ流路チップの開発、チップへの送液を全自動で行うための送液モジュールの開発、急性被ばく後のテロメア長の変化による被ばく線量評価の有用性検討、さらに、各個人の疾病情報や生体情報・生活習慣を加味したDNA損傷バックグラウンドデータの構築を行った。

1. γ H2AX 検出の全自動化および大量生産化に向けた PDMS チップの改良

PDMS マイクロ流路チップを用いた γ H2AX 検出の全自動化を目的として、まずは、PDMS チップへのシリンジポンプを利用した試薬導入の検討を行った。特に本年度は、血液サンプル、固定溶液、洗浄溶液、封入剤、といった異なる試薬の導入速度の制御にも着目し、最適な流速や送液時間などについて検討を行った。現段階におけるチップ内での γ H2AX 検出では、まず PDMS チップの流路内を PBS によってあらかじめ充填しておき、その後、希釈したヒト末梢血を流し込むことで流路内構造にリンパ球を捕獲する。この際、シリンジポンプによる PBS の充填には 5 uL/min の流速を、その後の血液および溶液の送液には 1 uL/min から 5 uL/min の幅の流速を用いて、最適な条件を検討した。流路内のリンパ球は DAPI 溶液により染色、染色した PDMS チップは蛍光顕微鏡下で観察を行い、蛍光画像を取得後、流路内におけるリンパ球捕獲効率をもとに送液制御方法の評価を行った。シリンジポンプによる送液の最適条件が確定したのちに、PDMS チップによる放射線照射血液サンプルに対する γ H2AX 検出実験を行った。

次に、PDMS チップの低コストでの大量生産化に向けて、よりシンプルな構造をもつリンパ球捕獲および γ H2AX 検出のための PDMS マイクロ流路チップを開発した。本件については、研究分担者を中心に立ち上げた大学発ベンチャー Dinow やそのほかの企業との連携によって実施された。ここで開発した大量生産型 PDMS チップについても、捕獲効率の評価に加え、上記実験で確立した条件を用いて、シリンジポンプを用いた γ H2AX 検出実験を行った。

2. PDMS マイクロ流路チップへの送液を全自動で行うための送液モジュールの開発

現在開発中の PDMS チップを用いた DNA 損傷解析デバイスは最終的に現場での利用を目指しているため、全自動化する必要がある。これまでは PDMS チップへの試薬等の送液はシリンジポンプを用いる場合でも手動で行ってきた。そこで、①複数の試薬を送液するためのバルブユニット、②PDMS チップでの γ H2AX 検出反応を行うための温調ユニット、③シリンジポンプユニットを統合し、送液を全自動で行うための試作デバイスの開発を行った。

本件についても、研究分担者を中心に立ち上げた大学発ベンチャー株式会社 Dinow の協力のもと実施した。

3. 急性被ばく後のテロメア長の変化による被ばく線量評価の有用性検討

放射線被ばくの痕跡を知るための長期的な被ばく線量評価マーカーとしてテロメアの短縮に着目し、これまでの研究で、線量依存的なテロメア短縮が照射後 1 週間、2 週間の細胞においても認められることを明らかにしている。そこで、ヒト正常線維芽細胞に放射線照射後、細胞培養を継続し、照射翌日、1 週間後、2 週間後のテロメア長を FISH 法により検出し再現性の確認および有用性の確認を行った。また、テロメア FISH 法だけではなく、より迅速かつ簡便にテロメア長を測

定できる方法として、テロメア配列に対する定量的リアルタイム PCR のキットを用いて、テロメア短縮と被ばく線量の相関性を検討することとした。

4. 全身照射マウス由来リンパ球における γ H2AX 免疫蛍光染色および測定

研究代表者である盛武班が作成した全身照射マウス由来のリンパ球を用いて γ H2AX 免疫蛍光染色を行った。研究代表者のグループによって X 線 0、1、3 Gy を照射されたマウスから経時的に（1日後、2日後、3日後、7日後）に血液サンプルを採取し（各線量、各タイムポイント 4 個体ずつとして、同様の実験を計 3 回実施した）、前処理後に凍結保存したのちに茨城大学に送付された。血液サンプルを PBS で数回洗浄後、細胞をサイトスピンによってスライドガラスに張り付けた。その後、 γ H2AX に対する一次抗体および蛍光二次抗体による蛍光免疫染色を行った。染色後は十分に洗浄し、退色防止剤を含む PI 溶液により封入した。染色したスライドサンプルは蛍光顕微鏡下で観察を行い、蛍光画像を取得後、DNA 損傷レベルの解析を行った。これまでに実施したすべてのマウス全身照射実験の結果を取りまとめるとともに、研究代表者にデータを共有し、そのほかのバイオマーカーとの組み合わせによる総合的被ばく線量評価システムの構築を目指した。

5. 個人の疾病情報や生体情報・生活習慣を加味した DNA 損傷バックグラウンドデータの構築

実社会において被ばく線量評価を DNA 損傷レベルなどのバイオマーカーによって行うにあたっては、個人の生活情報や疾病などの生体情報と DNA 損傷レベルとの相関性を明確しておく必要がある。そこで、健康人ボランティア生体サンプルを用いたデータベースの構築を目指したが、新型コロナウイルス感染拡大防止の観点から学内にて一般健康人からの採血の実施が困難であったため、新たなデータは蓄積されなかった。そこで、様々ながん患者における DNA 損傷バックグラウンドレベルの解析、さらにはがん患者の放射線治療における DNA 損傷レベルの変化を解析することで、疾患と DNA 損傷レベルの関係や、放射線被ばくを受けた患者の被ばく線量と DNA 損傷レベルの相関性解析を行うための予備的な解析を行った。

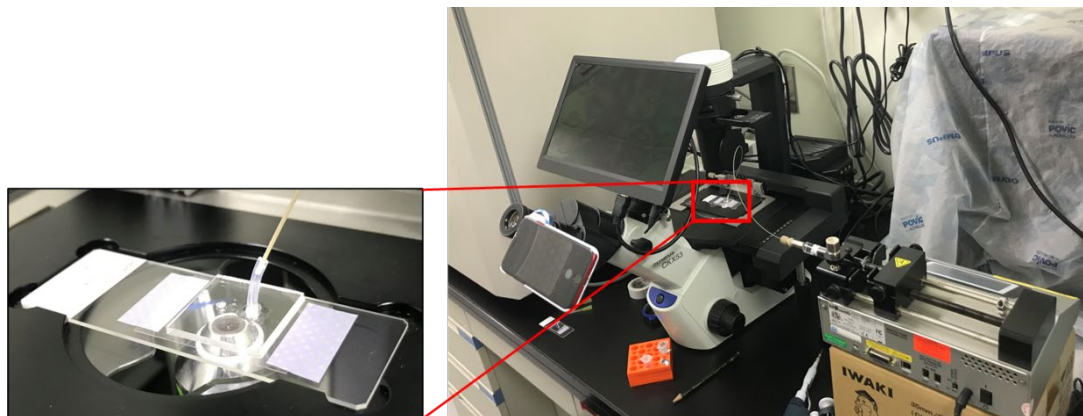
（倫理面への配慮）

本研究で用いるヒト培養細胞は市販されている培養細胞による解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。本研究におけるヒト血液サンプルを用いた実験は、茨城大学生命倫理規定に基づいた申請書を作成し、審査委員会による承認を受けているものである（承認番号 150401、研究課題名「新規放射線誘発 DNA 損傷モニタリングシステムの開発」、承認番号 190103、研究題名「DNA 損傷レベルと生物指標の相関性に関する研究」）。実施にあたっては、倫理指針に則り、調査開始に当たり、本研究の目的・意義・方法・侵襲度・予測される危険性などについて説明し十分な理解を得る。参加は、本人に不利益を被らせることがないように配慮する。また、いつでも自由意志で参加の同意の撤回ができ、途中で参加を中止しても、本人に何ら不利な取り扱いを受けないことを保障する。この様な内容について十分に説明を行い、調査を実施し、情報の漏洩がないように努める。データは被験者が特定できないように、個人情報識別管理者の管理の下で、被験者番号を付けて連絡可能匿名化し分析する。

III 研究結果

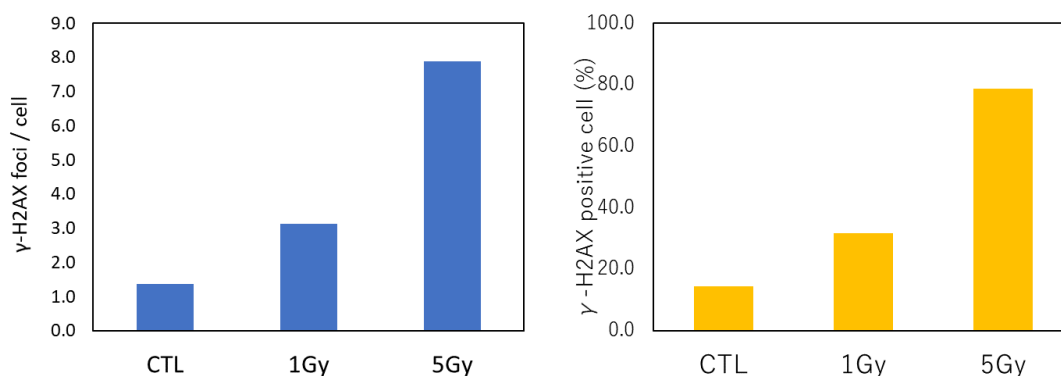
1. γ H2AX検出デバイスの開発および線量評価デバイスとしての有効性検討

PDMSチップを用いた γ H2AX検出の全自動化に向けて、シリンジポンプを用いた試薬の送液制御の最適化を行った（図III-1）。



図III-1 シリンジポンプを用いたPDMSチップの送液制御

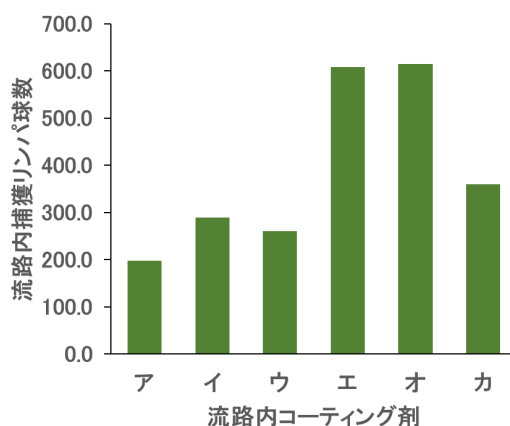
その結果、 γ H2AXに対する免疫染色後の洗浄工程において、シリンジポンプによる吸引の速度を2 uL/minと高めに設定することで、より明確な染色画像が得られること、明確に γ H2AXフォーカスを検出することが明らかとなった。実際に、X線を1 Gy、5 Gy照射した血液サンプルを用いた γ H2AX検出実験では、線量依存的な γ H2AXフォーカス数および陽性細胞数を検出することができた（図III-2）。このことは、開発したPDMSチップとシリンジポンプを組み合わせることで精度の良い γ H2AX検出が可能であることを示している。



図III-2 PDMSチップを用いた γ H2AX検出による放射線照射血液サンプルのDNA損傷レベルの経時変化（左）リンパ球あたりの γ H2AXフォーカス数の平均を示す（右） γ H2AXフォーカス陽性のリンパ球の割合を示す

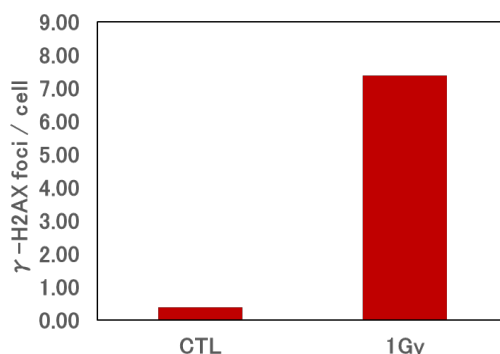
次に、PDMSチップの低コストでの大量生産化に向けて、よりシンプルな構造をもつリンパ球捕獲および γ H2AX検出のためのPDMSマイクロ流路チップを作成した。流路内の構造の改良だけでなく、マイクロ流路内をコーティングする薬剤の種類についても複数検討した結果、いずれのコーティング剤を用いた場合でも、200個以上のリンパ球を捕獲することが可能であることを確認した。特に、一部のコーティング剤を使用した場合には、安定して600個近いリンパ球を流路内に捕

獲・整列することが可能であることが確認された（図III-3）。このリンパ球数は、低線量・低線量率放射線被ばくによるDNA損傷レベルを検出するにも十分なリンパ球数であると考えられる。



図III-3 大量生産型PDMSチップを用いたリンパ球数捕獲効率の検討

さらに、ここで開発した大量生産型PDMSチップとシリンジポンプを用いて、放射線照射した血液サンプルに対する γ H2AX検出を行ったところ、X線 1Gy照射サンプルでは、予想されるDNA損傷レベルとほぼ同レベルの γ H2AXフォーカス数を検出することができた（図III-4）。



図III-4 大量生産型PDMSチップを用いた γ H2AX検出による放射線照射血液サンプルのDNA損傷レベルの経時変化

本研究で開発されたPDMSチップを用いたDNA損傷解析を全自動化するために、①複数の試薬を送液するためのバルブユニット、②PDMSチップでの γ H2AX検出反応を行うための温調ユニット、③シリンジポンプユニットを統合し、送液を全自動で行うための試作デバイスの開発を行った。試作デバイスによるPDMSチップへの送液などは問題なく行えることを確認したが、異なる試薬への切り替えの際の制御に軽微なエラー（送液用チューブ内の液量についての情報をプログラムに入れていなかったために発生）が生じることが明らかとなった。現在、制御システムの改良や、軽量化に向けた検討を行っている。

2. 被ばく線量評価バイオマーカーとしてのテロメア短縮の有用性検討

これまでの研究から0、1、5 Gyの放射線照射に対して線量依存的なテロメア長短縮がヒト正常

線維芽細胞で検出されていることから、その再現性を確認するとともに、1 Gy以下の線量に対しても線量依存的なテロメア長短縮が検出できるかを確認した。テロメア長の測定にはテロメア FISH法を用いたが、FISH法は熟練した技術を必要とすることに加え解析に長時間かかることから、今年度は安定した実験結果を得ることができなかった。そこで、テロメア長を定量的リアルタイムPCRによって測定する方法を検討した。一般的にテロメア配列は5'-TTAGGG-3'の繰り返し配列によって構成されているためPCR法では安定したデータが得られにくいと考えられていたが、近年はDNA合成酵素の質の向上や、ゲノム配列の解読によるより正確な増幅用プライマーデザインが可能となったことから、リアルタイムPCR法によるテロメア長の測定が可能となっている。現在、放射線照射したヒト正常線維芽細胞を継続して培養し、様々なタイムポイントにおいてゲノムDNAを抽出している。

3. 全身照射マウス由来リンパ球における γ H2AX免疫蛍光染色および測定

研究代表者の作成した同一の放射線照射マウスサンプルを用いて γ H2AX 検出を行った。DNA 損傷レベルと放射線被ばく線量の相関性について検討を行い、 γ H2AX による放射線被ばく線量評価の検出精度、検出限界、そして再現性を確認した。その結果、照射後3日目(72時間)までは線量と γ H2AX フォーカス数は比例関係にあることが示された(図 III-5)。照射後1日目における線量と DNA 損傷の相関関係は $y=0.4195x+0.1985$ (相関係数: $R^2=0.9879$)、2日目は $y=0.3489x+0.2101$ (相関係数: $R^2=0.9869$)、3日目は $y=0.188x+0.1974$ (相関係数: $R^2=0.9985$)、7日目は $y=0.0376x+0.1949$ (相関係数: $R^2=0.994$) であった。このことから、マウスサンプルにおける DNA 損傷のバックグラウンドレベルがリンパ球1細胞あたり0.2程度であること、照射後3日目以降では1Gy以下の被ばくによって生じた DNA 損傷はバックグラウンドによってマスクされてしまう可能性が示された。今回の結果から γ H2AX 検出による線量評価は照射後72時間以内であれば高精度に行うことが可能であることが証明された。 γ H2AX 検出と他のバイオマーカーとの組み合わせによる包括的な線量評価法については、研究代表者の報告書にて示す。

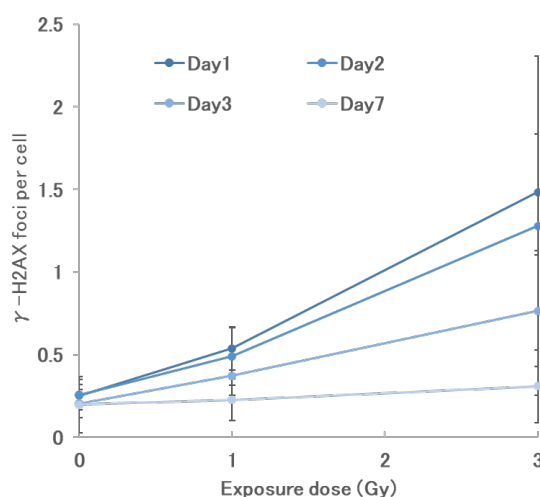


図 III-5 全身照射マウス由来リンパ球における DNA 損傷レベルの経時変化

IV 考察

今年度はDNA損傷レベルの検出および放射線被ばく線量評価を迅速に行うためのPDMSマイクロ流路チップについて、大量生産化および解析の全自動化を見据えた開発を行った。その結果、送液制御については、免疫染色を行った後の洗浄工程においてやや早めの流速とすることで、 γ H2AXのフォーカスをより明確に検出することが可能であることが示された。また、大量生産型のPDMSチップについても、十分なリンパ球の捕獲構造を確立したことに加え、放射線線量依存的な γ H2AX検出がシリンジポンプによる送液制御によって可能であることが示された。このことは、大量生産型のPDMSチップと開発中の全自動デバイスを組み合わせることで、「現場」にて迅速かつ大規模な γ H2AX検出による被ばく線量評価を行うことができる可能性を示している。

また、今回、テロメア短縮の検出にFISH法を用いることは簡便性やデータの安定性を考慮すると最適な手法ではないと考え、定量的リアルタイムPCR法による解析を開始した。今後は放射線被ばく後の長期的な線量評価指標としてテロメア短縮が有効であるかを検討する。また近年マイクロ流路チップは様々な用途へ展開されており、リアルタイムPCR用のチップも開発されている。そこで、今後はテロメア長測定にも応用できるPDMSマイクロ流路チップの開発も検討する。

同一生体サンプルを用いた γ H2AXを用いたDNA損傷レベルの検出および被ばく線量評価実験においては、照射3日後（72時間）までは、1 Gy以上の放射線被ばくをした際に γ H2AX検出により正確に被ばく線量を推定することができることが示された。また、 γ H2AX検出だけでなく、そのほかのバイオマーカー指標と組み合わせることでより高精度の被ばく線量評価が可能であることが示された。

V 結論

- ① 微量のヒト血液サンプルを用いてDNA損傷の測定を現場で迅速かつ簡便に行うための新規マイクロ流路チップを開発するとともに、チップへの送液を全自動で行うための送液モジュールを開発した。
- ② 長期被ばくバイオマーカーとしてテロメア短縮に着目し、これまでのFISH法ではなく、定量的リアルタイムPCR法によるテロメア長測定を開始した。
- ③ 被ばくマウスモデルを用いたDNA損傷レベルの結果は研究代表者と共有し、血液抗酸化能など、そのほかのバイオマーカー指標との組み合わせによって、各指標単独よりも精度良く被ばく線量を推定できることを明らかにした。

VI 次年度以降の計画

- ① 全自動のDNA損傷測定システムの開発を行う。株式会社Dinowを中心に自治体・企業・医療機関と連携し、現場でのテスト導入に向けた検討を開始する。
- ② 長期被ばくバイオマーカーとしてのテロメア長短縮の有用性を定量的リアルタイムPCR法によって確認する。また、テロメア長検出を現場で簡便に行うことができるマイクロ流路チップの開発を開始する。
- ③ 健常人ボランティアや放射線治療患者由来の試料、さらには福島野生ニホンザルの試料を用いてDNA損傷レベルと様々な生体指標との相関性解析を行い、個人の生体情報・生活習慣とバイオマーカーの相関性についてのデータベース構築を目指す。
- ④ 得られたデータは研究代表者に提供し、放射線被ばくの健康影響評価が可能なバイオドシメト

りの確立を目指す。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 雑誌の場合

該当なし

イ) 単行本の場合

該当なし

引用文献

- 1) Bonner WM Redon CE Dickey JS Nakamura AJ Sedelnikova OA Solier S Pommier Y. GammaH2AX and cancer. Nat Rev Cancer. 2008; 12: 957-967.

Development and future application of biodosimetry method using γ -H2AX assay in the field using PDMS microfluidic chip

Asako J. Nakamura¹, Kenta Takahashi¹, Takaaki Suzuki²

1 Department of Biological Sciences, College of Science, Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo, Mito, Ibaraki 310-8515, Japan

2 Division of Mechanical Science and Technology, Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma, 376-8515, Japan

Key words: H2AX, PDMS microfluidic chip, DNA damage, telomere, biodosimeter

Abstract

Exposure to radiation causes various DNA lesions, including DNA double-strand breaks (DSBs). Although most DNA damage can be repaired, the DNA repair function is not fully integrated and can occasionally lead to genetic mutations that might cause cancer and cellular senescence. Therefore, biodosimetry methods based on the monitoring of DNA damage are useful for evaluating the biological effects of radiation.

Although dicentric chromosome analysis (DCA) is the mainstream biodosimetry method, it takes several days to get results and is not suitable for mass-casualty situations that require immediate analysis in the field. In contrast, evaluation of DNA damage using phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) is more sensitive and faster (less than 24 hours) to obtain results, making it suitable for rapid triage on site. However, there are still some challenges in radiation effect assessment based on the γ -H2AX assay.

In this study, a polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic chip (PDMS chip) was developed to facilitate DNA damage assessment based on γ -H2AX assay on it. The PDMS chip has a lymphocyte capture structure in its flow path, and the γ -H2AX assay can be performed directly on the chip for captured lymphocytes. We have performed γ -H2AX assays on human peripheral blood lymphocytes exposed to X-rays using the PDMS chip, and the results showed a dose-dependent increase in DNA damage at doses above 1 Gy.

On the other hand, the γ -H2AX assay is problematic since the γ -H2AX foci disappear by about 72 hours after radiation exposure depending on DNA damage repair. To solve this problem, we evaluated the shortening of telomere length as a biodosimeter for assessment of exposure dose at later than 72 hours after exposure.

As a result, our data strongly show that PDMS chip is usable in DNA damage evaluating device and make it possible to assess the biological effects of radiation rapidly on-site. Our data also suggest that the measurement of telomere length might be suitable as a biodosimeter to evaluate the exposure dose later than a week after radiation exposure.